

JATE Kibernetikai Laboratorium, SZOTE Anatomiai Intézet

Synapticus vesiculák megoszlásának vizsgálata matematikai módszerekkel a harántcsikolt izom motoros véglemében

Hunya Péter, Bense Sándor, Nagy Péter, Csillik Bertalan

A gerincvelői parancsokat közvetítő mozgató idegrost /axon/ motorikus véglemez formájában kapcsolódik a harántcsikolt izomrosttal. A mozgató ideg végágai kiboltosulnak, s beléfküsznek az izomrost felszíni hártýája alkotta vályukba. /1. ábra/. A kiboltosuló idegvégzódásban synaptikus vesiculákat /átmérő: 400 \AA /, mitochondriumokat /átmérő: $0,1-1 \text{ \mu m}$ / és neurotubulusokat találunk /átmérő: 240 \AA /.

DALE, FELDBERG és VOCT /1936/ nyomán ismeretes, hogy a motoros véglemezben az ingerület áttétele kémiai mediáció révén, acetylcholin segítségével történik. De ROBERTIS már 1954-ben feltételezte, hogy a synaptikus vesiculák az acetylcholin hordozói. Azóta több megfigyelés utalt már arra, hogy valóban a vesiculák transportálják az acetylcholint az idegrost belsejéből annak felszíni hártýája, a prae-synaptikus membrán felé; objektív bizonyíték azonban a vesiculák ilyen mozgására nézve nincs. Mások ugyanis feltételezték, hogy a synaptikus vesiculák a prae-synaptikus membránból fúzódnek le, tehát óppenséggel fordított irányu mozgást végeznek. - A szabályos gömbalaku vesiculák mellett kisebb-nagyobb számban találhatók megnyult, szabálytalan, atypikus vesiculák is; ezek jelentőségét nem tudjuk, de feltételezik, hogy ezek in statu nascendi vesiculáknak felelnek meg.

Vizsgálataink célja az volt, hogy exakt matematikai módszerekkel megállapítsuk: okoz-e a supramaximális ingerlés szignifikáns változást a vesiculák számában, eloszlásában és tömörültségében. A feltételezett vesicula-mozgás ugyanis olyan redistribúcióhoz kell vezessen,

hogyan aktivitás során a vesiculák a prae-synaptikus membrán /a "frontonon"/ közelében tömörülnek. Kérdés továbbá, megváltozik-e az atypikus vesiculák számaránya és eloszlása, valamint tömörültsége.

Vizsgálatainkat 8 db 160 g súlyú fehérpatkányon végeztük. Az állatok jobb oldali n.ischiadicusát hexobarbital narkózisban kipreparáltuk és 1.2 V feszültségű, 50 Hz frekvenciájú, 20 %-os négyszögű ingerekkel ingereltük 60 percig. Utána mindkét oldali m.flexor digitorum brevis-t kiemeltük, Karnovsky-féle formaldehyd-oldatban rögzítettük 2 órára, majd a szokásos módon, víztelenítés után Durcupan-ba ágyztuk. Szürke interferencia-színű /kb. 300 Å/ ultrametszeteket készítettünk Reichert-féle Ultratommal, üvegkés segítségével. A metszeteket 300 nyílású rézrostélyokra vettük fel, s Reynolds-féle ólomcitráttal kontrasztoltuk. A metszeteket Tesla 513 B elektronmikroszkóppal vizsgáltuk, s mind a kontroll, mind az ingerelt izomból 40-40 motorikus véglemezt kifényképeztünk 18,500-szoros nagyítás mellett. A negatívokról 2.5-szeres nagyítású papírkópiákat készítettünk.

A továbbiakban megadjuk a felvételek vizsgálatára alkalmazott matematikai, számítástechnikai módszert, majd ismertetjük az elvégzett számítások eredményeit és azok értelmezését.

Vizsgálatainkban - matematikai szempontból - adott egy síkbeli összefüggő, zárt tartomány /az idegvégződés metszete/, melynek határvonalát két összefüggő részre bontjuk /a prae-synaptikus membránra és a határvonal megmaradó részére/. Ezen G tartomány g határvonala legyen leírható az

$$\begin{aligned}x &= x/s/ & 0 \leq s \leq 1 \\y &= y/s/\end{aligned}$$

függvényekkel. Az $x/s/$, $y/s/$ függvények folytonosak és eleget tesznek az

$$\begin{aligned}x/0/ &= x/1/ \\y/0/ &= y/1/\end{aligned}$$

feltételnek. /2. ábra/ A határvonal egyik szakaszát $/g_1\text{-et}/$ a

$$0 \leq s \leq t$$

feltétel, a másikat $/g_2-t/$ pedig a

$$t < s \leq 1$$

feltétel határozza meg.

Adott továbbá bizonyos típusu anyag /esetünkben vesicula/ mennyiségi eloszlása a \underline{G} tartományon az $n = f/x,y/$ függvénykapcsolattal. Az $f/x,y/$ integrálható \underline{G} -n és

$$\begin{aligned} n &\geq 0, & \text{ha } /x,y/ \in G \\ n &= 0, & \text{ha } /x,y/ \notin G \end{aligned}$$

Feladatunk megoldásához meg kell adnunk egy olyan transzformációt, mely az $A = A/G, g_1, g_2, f/$ alakzatnak megfeleltet egy mértéket, amely a vizsgált anyagnak a g_1 ill. a g_2 -höz való tömörültségi viszonyait fejezi ki. E mellett a definiált mértéknek utalnia kell a \underline{G} -ben levő anyag összmenyiségére, sűrűségére is. A keresett transzformáció tehát

$$M = /R,Q/ = T/A/$$

alakú, ahol Q az anyag sűrűségét jelöli. Nyilvánvaló, hogy

$$Q = \int_{\underline{G}} f/x,y/dxdy / \int_{\underline{G}} dxdy.$$

\underline{R} definíciójához a következő módon jutunk el:

Értelmezzük először egy adott pontban elhelyezett egységnyi anyagmennyiség tömörültségét adott ponthoz.

Legyen ez elektromos analógia alapján a Coulomb-törvénynek megfelelően

$$a \quad C_{P,e} = \frac{1}{r^2}$$

függvénnyel leírható. r az egységnyi anyagmennyiség távolságát jelent a P ponttól.

\underline{m} tömegű anyag esetén ugyan ilyen elhelyezkedési viszonyok mellett a tömörültség legyen arányos \underline{m} - mel, azaz

$$C_{P,m} = m \cdot C_{P,e} = \frac{m}{r^2}.$$

Kiterjedt G tartományon elhelyezkedő anyagnál, $f/x,y/$, anyageloszlás mellett közénfekvő az előzők általánosításaként a tömörültséget a

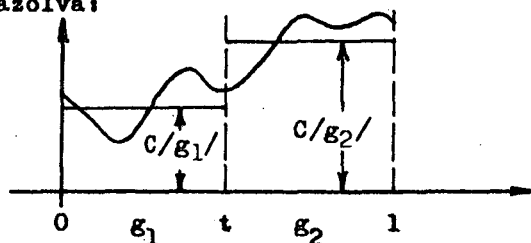
$$C_p = \int_G \frac{f/x,y/}{\sqrt{(x-x_p)^2 + (y-y_p)^2}} dx dy$$

integrállal jellemzi. Ez az érték megadható mind a g_1 , mind a g_2 összes pontjára:

$$g_1: C/s/ = \int_G \frac{f/x,y/}{\sqrt{(x-x/s)^2 + (y-y/s)^2}} dx dy \quad 0 \leq s \leq t,$$

$$g_2: C/s/ = \int_G \frac{f/x,y/}{\sqrt{(x-x/s)^2 + (y-y/s)^2}} dx dy \quad t < s \leq 1.$$

Grafikusan ábrázolva:



Az átlagos tömörültséget g_1 -en és g_2 -n pedig a

$$C/g_1/ = \frac{1}{t} \int_0^t C/s/ ds,$$

és a

$$C/g_2/ = \frac{1}{1-t} \int_t^1 C/s/ ds$$

integrálközepek adják meg.

Ezek a mennyiségek már alkalmasak a kívánt viszonyok jellemzésére, mivel előállításuknál fogva függetlenek a konkrét topológiai képtől. A fentiek alapján legyen

$$R = \frac{C/\varepsilon_1/}{C/\varepsilon_2/}$$

A kapott tömörültségi mérték formailag a következő alakú:

$$C/\alpha, \beta, f/ = \frac{\int_{\alpha}^{\beta} \int \frac{f/p/}{d/p,q/} dpdq}{\int_{\beta}^{\alpha} dq}$$

ahol α és β tartományokat jelölnek. Feladatunkban α nikgörbe, β zárt tartomány volt, de ezen felirásból kitűnik, hogy az így definiált $C/\alpha, \beta, f/$ tetszőlegesen mérhető tartományon elosztott anyag tetszőlegesen mérhető tartományhoz való tömörültségének mértékéül is szolgálhat. Ezzel lehetőséget nyertünk pl. két különböző anyag tömörültségének összehasonlítására a

$$C/\alpha, \beta, f_1/ \text{ és } C/\alpha, \beta, f_2/$$

összevetésével.

A számítógépen feldolgozáshoz az elektronmikroszkópiai felvételeket természetesen közvetlenül felhasználni nem lehetett, azokat előbb kódolni kellett. Minden felvételnek egy mátrixot feleltettünk meg, melynek elemei adták $f/x,y/-t$, a területegységekben található vesiculák számát. A határvonalat negatív mátrixelemek jelölték. A tömörültségi jellemzőkben a számítógépen reprezentációnál az integrálok helyett, végesek összegek szerepeltek.

A megoldandó biológiai feladatnál adva volt alakzatok két sorozata:

$$A_i \text{ /a/ és } A_i \text{ /c/} \quad /i=1,2,\dots,20/$$

a szupramaximálisan ingerelt, illetve a kontroll anyagnak megfelelően. Minazk-22-re készült program segítségével meghatároztuk a hozzájuk tartozó

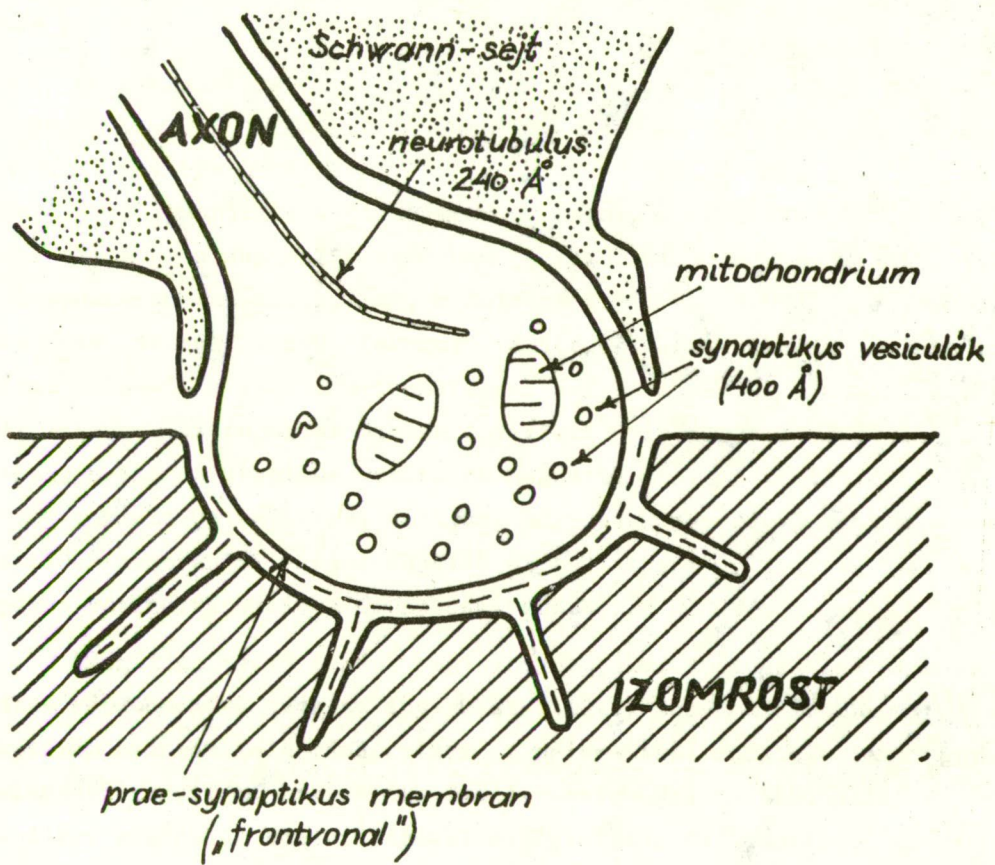
$$M_i \text{ /a/ és } M_i \text{ /c/} \quad /i=1,2,\dots,20/$$

sorozatok és matematikai statisztikai módszerrel összehasonlítottuk az R és a Q várható értékét. Az összes vesiculára vonatkozó számításoknál az R-ben szignifikáns különbséget kaptunk, Q-ban azonban nem. A tömörültséget grafikusan ábrázolva /3.ábra/ jól látható a szupramaximálisan ingerelt és a kontroll anyag szétválása. A függőleges tengelyen az egyik, a vízszintesen a másik típusu falszakaszhoz való tömörültségeket tüntettük fel. A körrel jelöltek alkotják a szupramaximálisan ingerelt csoportját. Az atypikus vesiculáknál viszont csak a Q átlagára kaptunk szignifikáns eltérést.

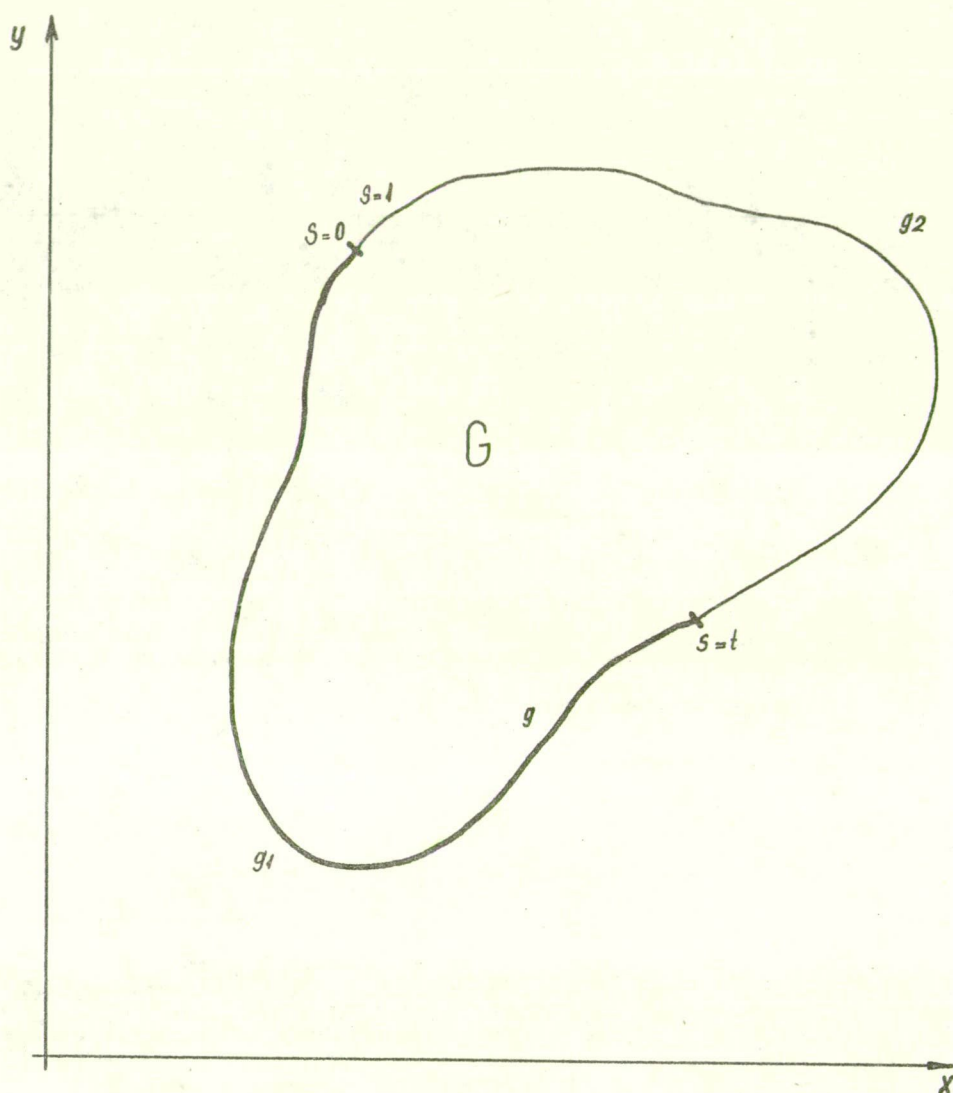
A matematikai analízis alapján kitűnik, hogy a szupramaximális ingerlés hatására a synaptikus vesiculák a frontvonalon, tehát a prae-synaptikus membrán közelében tömörülnek. Ez a redistribúció világosan bizonyítja a synaptikus vesiculáknak az ingerlés során történt elmozdulását. Az, hogy a vesiculák számában jelentős változás nem következett be, összhangban van azzal, hogy a feltételezett nagyobb arányú vesicula-termelődést hasonló mérvű, fokozott vesicula-felhasználódás kíséri. Hogy valóban fokozott a vesicula-termelődés, azt bizonyítja az atypikus vesiculák számának az ingerlés hatására észlelt szignifikáns emelkedése. Minthogy pedig az atypikus vesiculák megoszlásában és tömörültségében nem következett be változás, világos, hogy ezek nem képződhettek a prae-synaptikus membránból való lefűződés útján, tekintve, hogy ez esetben az atypikus vesiculáknak is a frontvonal közelében kellene halmozódniuk.

Megállapítható tehát, hogy a synaptikus vesiculák az axon belsőjében képződnek és azok az ingerület-átvitel folyamata során a prae-synaptikus membrán felé vándorolnak. A matematikai analízis tehát egyértelműen bizonyítja, hogy a transmitter-anyag /az acetylcholin/ a synaptikus vesiculák közvetítésével szállítatik felhasználási helyére: a prae-synaptikus membránhoz.

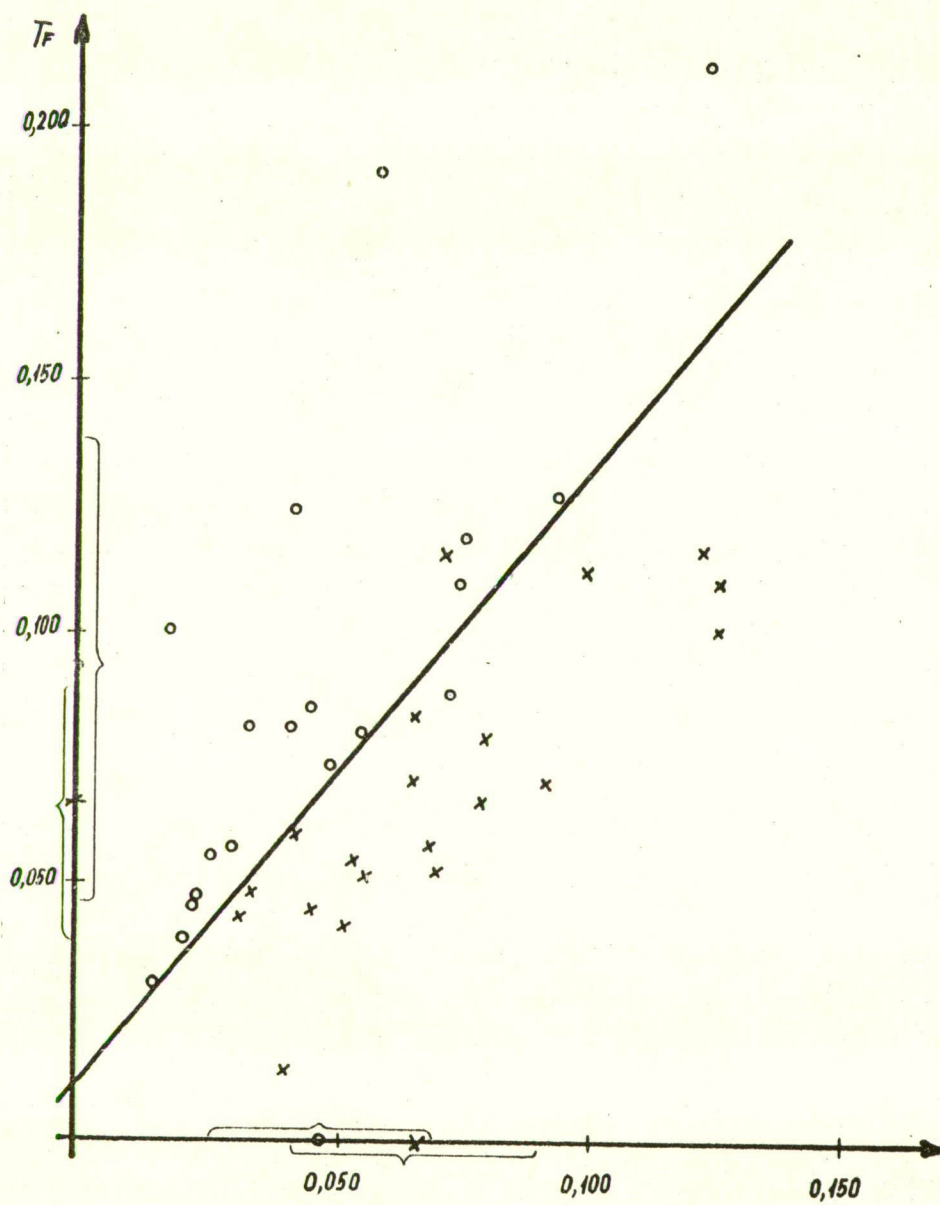
Megjegyzendő, hogy tudomásunk szerint szubmikroszkópos strukturelemek dinamikájának objektív vizsgálatára világviszonylatban is ez alkalommal került először sor a számítógépes technika alkalmazására. Az eljárás elve más ultrastrukturális elemek vonatkozásában is alkalmazható a finom biológiai szerkezet funkcionális változásainak tanulmányozására.



1. ábra



2. ábra



3. ábra

